

# ワルファリン投与下マウス一過性中大脳動脈閉塞後の出血性変化に対する新規血栓溶解薬SMTP-7の治療効果

著者	伊藤 明
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16220号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/61155">http://hdl.handle.net/10097/61155</a>

ワルファリン投与下マウス一過性中大脳動脈閉塞後の出血性変化に対する  
新規血栓溶解薬 SMTP-7 の治療効果

東北大学大学院医学系研究科 医科学専攻  
神経・感覚器病態学講座 神経外科学分野  
伊藤明

## [1] 要約

*Stachybotrys microspora* triprenyl phenol-7 (SMTP-7)は抗炎症作用および抗酸化作用を有する新規血栓溶解薬である。SMTP-7は、虚血性脳卒中における血栓溶解薬として広く使用されている遺伝子組み換え組織型プラスミノゲン・アクティベータ (recombinant tissue plasminogen activator: rt-PA)と比較して、有意に脳梗塞体積を縮小することが動物実験において報告されている。また、血栓溶解療法における最大の合併症である出血性合併症が、rt-PA 静脈内投与と比較して少ないことも報告されている。特に、ワルファリン内服中の患者においては出血性合併症の危険から rt-PA 静脈内投与が禁忌となることが多く、血栓溶解療法が不可能になってしまう。従って、安全性の高い新規血栓溶解薬が望まれている。そこで、出血性合併症の少ない SMTP-7 が、ワルファリン内服下においても有用かつ安全であるという仮説を基に本研究を計画した。

本研究ではマウス一過性中大脳動脈閉塞モデルを使用し、ワルファリン投与下での虚血性脳卒中における SMTP-7 の有用性と安全性を検討した。術前 24 時間ワルファリンを経口投与し十分な抗凝固療法を行った(PT-INR [prothrombin time-international normalized ratio]  $5.6 \pm 0.2$ ) 後に、全身麻酔下にマウスの左中大脳動脈を血管内塞栓糸により閉塞し、3 時間後に塞栓糸を抜去し再灌流した。再灌流 5 分前から生理食塩水、rt-PA、または SMTP-7 を経静脈的に投与し、以下のごとく各薬剤による治療の影響を比較検討した。再灌流 24 時間後に脳サンプルを採取し、出血性変化の重症度、脳梗塞体積、および脳浮腫の程度を検討した。また、再灌流 24 時間以内の死亡率、再灌流 24 時間後の神経障害の重症度を検討した。さらに、虚血再灌流後の出血性変化の一因であるマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (matrix metalloprotease-9: MMP-9)の活性化による血液脳関門の破綻を以下の方法で検討し

た。MMP-9 の活性を評価するためにゼラチンザイモグラフィーを行った。さらに、MMP-9 の基質であり基底膜の主要構成成分である IV 型コラーゲンの破壊を組織学的に検討した。最後に、血液脳関門の機能的破綻を評価するために静脈内投与されたエバンスブルーの脳実質内漏出の程度を検討した。

非治療対照群および rt-PA 治療群と比較して、SMTP-7 治療群では再灌流 24 時間後の脳梗塞および脳浮腫の程度は軽度となる傾向を認めたが、統計学的有意差を認めなかった。しかし、再灌流 24 時間後の出血性変化は rt-PA 治療群と比較すると SMTP-7 治療群で有意に軽度であった。さらに、その出血形態は点状出血のみで脳実質内出血を呈することはなかった。また、再灌流 24 時間以内の死亡率は非治療対照群で 20% および rt-PA 治療群で 50% であった一方で、SMTP-7 治療群は全例が 24 時間生存可能であった。さらに、再灌流 24 時間後の神経障害も、非治療対照群および rt-PA 治療群と比較して SMTP-7 治療群では有意に軽度であった。これは、rt-PA 治療群の神経障害が非治療対照群と比較して有意に高度であったことと対照的であった。また、再灌流 24 時間後のゼラチンザイモグラフィーにおいて、SMTP-7 治療群では MMP-9 の活性が有意に低いことが示された。さらに、MMP-9 の基質である IV 型コラーゲンの破壊も SMTP-7 治療群で有意に軽度であった。エバンスブルーの脳実質内漏出も SMTP-7 治療群では有意に軽度であることが示され、血液脳関門の機能的破綻が抑制されることが示唆された。

以上の結果から、SMTP-7 は血栓溶解作用に加えて、MMP-9 の活性化抑制を介して血液脳関門破綻に抑制的に働くことにより、ワルファリン内服下における虚血再灌流後の出血性変化を抑制し、機能および生命予後も改善することが示唆された。

SMTP-7 は rt-PA が禁忌となるワルファリン内服患者においても安全に使用できる血栓溶解薬になり得ると考えられた。



## [2] 研究背景

遺伝子組み換え組織型プラスミノゲン・アクティベータ(recombinant tissue plasminogen activator: rt-PA)の静脈内投与による虚血性脳卒中超急性期の血栓溶解療法は既に確立された治療法である<sup>1,2)</sup>。しかし一方で、rt-PA 静脈内投与を受けた患者の約 2.4 - 8.8%が致命的となり得る出血性合併症を呈すると報告されている<sup>3-5)</sup>。この出血性合併症により血栓溶解療法の therapeutic time window が制限され、一度出血性合併症が生じると転帰不良となることが知られている<sup>3-5)</sup>。欧米の大規模臨床試験である the National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS)および the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) rt-PA trial において症候性の出血性合併症を考慮しても rt-PA 静脈内投与は脳梗塞超急性期治療として有用であることが明らかであるが、rt-PA 静脈内投与による利益が出血性合併症により制限されることも同時に報告されている<sup>3,6)</sup>。また同臨床試験においては、ワルファリン内服患者はそのような出血性合併症の危険因子と考えられ除外されており<sup>3,6)</sup>、本邦の脳卒中ガイドラインにおいてもプロトロンビン時間国際標準比(prothrombin time-international normalized ratio: PT-INR)が1.7より延長している患者ではrt-PA 静脈内投与は禁忌となっている<sup>7)</sup>。現在、本邦では高齢者の急増により心房細動を有する患者が増加しており、この傾向は2030年まで続くとされている<sup>8)</sup>。よって、今後は心房細動の増加に従いワルファリン内服患者も増えることも予測され<sup>8)</sup>、rt-PA 静脈内投与による血栓溶解療法を受けられない患者も増加することが考えられる。

以上のように脳梗塞急性期における血栓溶解療法の再大の問題点は出血性合併症であり、血栓溶解療法の適応拡大および脳梗塞の予後改善のためには、出血性合併症が少なくより安全性の高い新たな血栓溶解薬の開発が望まれる。本研究室では以前よ

り新規血栓溶解薬 *Stachybotrys microspora* triprenyl phenol-7 (SMTP-7)に注目し研究を行ってきた。SMTP-7は新規の低分子血栓溶解薬である<sup>9)</sup>。この化合物はビタミンEに類似した構造を持ち、プラスミノゲンの構造を変化させプラスミノゲン・アクティベータによるプラスミンへの変化を促進することにより血栓溶解作用を示す<sup>9,10)</sup>。その血栓溶解作用の特徴としてはrt-PAよりも緩徐かつ持続的に作用するということが挙げられる<sup>11)</sup>。またプラスミノゲン活性を約100倍まで増加させる一方で、プラスミノゲン・アクティベータの活性そのものには影響しないことも重要な特徴である<sup>12)</sup>。しかし、SMTP-7の最大の特徴は抗炎症作用および抗酸化作用を有し、血栓溶解作用以外に神経保護的にも働くという点である<sup>11,13,14)</sup>。SMTP-7の血栓溶解作用はrt-PAよりも微弱であるが<sup>12)</sup>、この抗炎症作用と抗酸化作用を有することによりSMTP-7が血栓塞栓症の動物モデルにおいてrt-PAよりも有意に脳梗塞巣を縮小させることが報告されている<sup>11,13,15,16)</sup>。本研究室でも、血栓塞栓症モデルではなく血管内塞栓系による一過性中脳動脈閉塞モデルを用いることにより、血栓溶解作用を無視したSMTP-7の神経保護作用のみに着目した研究を行い、その神経保護作用のみでもSMTP-7が脳梗塞巣を縮小させるということを報告してきた<sup>16)</sup>。さらに注目すべきは、SMTP-7が脳梗塞巣を縮小するだけでなく、虚血再灌流後の出血性変化を抑制するという動物実験の結果である<sup>11)</sup>。SMTP-7が出血性変化の重要な要因とされるマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (matrix metalloprotease-9: MMP-9)<sup>17-20)</sup>の活性を抑制することを過去に我々は報告しており<sup>16)</sup>、SMTP-7が出血性変化を抑制する一因ではないかと推測される。以上より、出血性合併症の少ないSMTP-7はrt-PA静脈内投与が禁忌のワルファリン内服下においても出血性変化を抑制し、安全に使用可能な血栓溶解薬になり得る可能性が示唆されている。

### [3] 研究目的

本研究室では、血栓溶解薬として、SMTP-7 の臨床応用を目標としている。SMTP-7 は現行の血栓溶解薬である rt-PA よりも優れた血栓溶解薬である可能性もあるが、現段階では、rt-PA の恩恵を享受できない population に対する血栓溶解療法の適応拡大を目的として、まず rt-PA 禁忌であるワルファリン内服下での PT-INR 延長症例における使用を検討している。しかし、SMTP-7 が rt-PA と比較して安全性が高くより有益な血栓溶解薬であることは動物実験において既に報告されているが、ワルファリン投与下での安全性および有用性に関してはまだ報告がされていない。よって本研究の目的は、ワルファリン投与下マウスでの虚血性脳卒中における SMTP-7 の安全性と有用性を明らかにすることである。

### [4] 研究方法

本研究全体のタイムコースを図 1 にシェーマで示した。

#### 1) マウス経口抗凝固療法モデル

ワルファリンは可溶性が非常に高いことが知られており、本研究においては Foerch らの方法に準じて水に溶解したワルファリンを給水瓶よりマウスに投与し、経口抗凝固療法を行った<sup>21-23)</sup>。8 – 9 週齢の雄 C57BL/6J マウス(Japan SLC, Shizuoka, Japan)に 5 mg のワルファリン錠(warfarin sodium, crystalline, 0556-0172-70, Bristol Myers Squibb, Munich, Germany)を 375 ml の水に溶解した溶液を給水瓶に入れ投与した<sup>21-23)</sup>。この投与方法では、マウスが 24 時間で体重 100 g 当たり 15 ml 飲水すると仮定すると、24 時間の飲水でワルファリン 2.00 mg/kg を投与した計算になる<sup>21-23)</sup>。本研究では CoaguChek (410350009, Roche, Basel, Switzerland)を用いて PT-INR を測定し平均値  $5.6 \pm 0.2$  を得た。この PT-INR の延

長は実臨床を模倣するには過度であるが、SMTP-7 のワルファリン投与下における安全性をより強調するために、あえてこの値を採用した。

## 2) マウス一過性中大脳動脈閉塞モデル

本研究では薬剤の副作用である出血性変化に関して検討するために、血栓塞栓症モデルではなく、血栓溶解作用を無視した血管内塞栓系を用いた一過性中大脳動脈閉塞モデルを採用した<sup>18)</sup>。薬剤関連性傷害を評価するために、血管内塞栓系を中大脳動脈の起始部より抜去して再灌流させる 5 分前から後述の薬剤を投与した<sup>24)</sup>。一般的に汎用されている血管内塞栓系によるマウス一過性中大脳動脈閉塞モデルは後交通動脈の発達の違いにより後大脳動脈領域も梗塞巣に含まれてしまうことがあるが、Akamatsu らは塞栓系の長さや太さを調整し、さらなる脳表の血流を *in vivo* で評価することにより後大脳動脈領域を梗塞巣に含めないモデルを確立し報告している<sup>25)</sup>。本研究では、このモデルに若干の修正を加えることにより、ワルファリン内服下でも高い再現性と生存率を有する出血性梗塞モデルを作成した。マウス前脳背側表面における前大脳動脈および中大脳動脈、後大脳動脈、各々の血管支配領域を図 2A に示した。血管内塞栓系として、先端部を径  $0.23 \pm 0.02$  mm および長さ 1.5–2.0 mm でシリコン被覆した 6-0 ナイロン糸を用いた。ワルファリンを 24 時間投与した後に、マウスを自発呼吸下で酸素 30% と一酸化窒素 70% の混合ガスにイソフルレンを 1.2–1.5% で混合した吸入麻酔にて麻酔し手術を行った。術中は保温器(BWT- 100, Bio Research Center, Nagoya, Japan)にて直腸温を  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  に調節した。この麻酔条件下での虚血負荷前後および再灌流後の血圧と血液ガス分析を行った。血圧は非観血的血圧計(BP-98, Softron, Tokyo, Japan)にて測定した。血液ガス分析は左大腿動脈に PE-10 カテーテル(427400, Becton Dickinson, New Jersey, USA)を留置し動脈血を採取し行った。マウスを腹臥位とし固定器(SG-4N, Narishige, Tokyo, Japan)で頭部

を固定した。頭皮を剃毛した後に正中切開し両側大脳半球および小脳半球上の薄い頭蓋骨を露出させた。頭蓋骨の表面には生理食塩水で覆った後にスライドガラスを乗せた。基準となる術前の脳血流値をレーザースペckル血流画像化装置(laser speckle flowmetry: LSF) (OMEGAZONE, Omegawave, Tokyo, Japan)を用いて経頭蓋的に1分間測定した。LSFを用いた脳血流の測定はAkamatsuらの方法に準じた<sup>25)</sup>。脳血流測定の間、780 nmのレーザー光で頭蓋骨表面をびまん性に照射し、生じた散乱光をフィルターにかけ頭蓋骨上に設置された電荷結合性カメラで検出した。フィルターは投下光に対して垂直偏向の散乱光のみを検出した。信号処理はForresterらが開発したアルゴリズムを用いて行った<sup>26)</sup>。この装置のセッティング方法により大脳半球背側表面の相対的な脳血流を測定した(図2B)。続いて、マウスを仰臥位に再固定(図2C)し頸部に正中切開をおき、顕微鏡下に左総頸動脈を迷走神経から剥離した(図2D)。上甲状腺動脈は凝固切開し外頸動脈を露出し末梢側で7-0ナイロン糸にて結紮し、結紮部のさらに末梢で凝固した。後頭動脈は凝固切断した。外頸動脈の起始部に5-0絹糸を巻き付け結紮の準備をした。外科クリップ(MH-1-20, BEAR Medic, Tokyo, Japan)を用いて内頸動脈を、7-0ナイロン糸を用いて総頸動脈をそれぞれ一時遮断した。前述の血管内塞栓糸を外頸動脈においた小切開から総頸動脈の分岐部まで挿入した。外科クリップによる内頸動脈の一時遮断を解除し外頸動脈を切断し、塞栓糸を内頸動脈に進めた。塞栓糸の先端が内頸動脈内に到達したら、先ほど準備していた5-0絹糸で外頸動脈を結紮し小切開からの出血を予防した後に総頸動脈の一時遮断を解除し血流を再開させた。塞栓糸を総頸動脈の分岐部から内頸動脈に軽い抵抗を感じるまで $9.0 \pm 0.5$  mm挿入した(図2E)。塞栓糸を創内に隠し創を6-0ナイロン糸で縫合した。続いて、マウスを再び腹臥位として脳血流を測定し、後大脳動脈領域を含めず中大脳動脈領域のみの血流が低下していることを確認した(図2F)。参考ま

でに後大脳動脈領域まで虚血に陥っているマウスの脳血流の例を図 2G に示した。マウスを覚醒させ虚血を負荷したまま待機した。虚血負荷開始 2 時間 45 分後からマウスに再度麻酔をかけ腹臥位で固定した。脳血流を評価し脳血流低下が自然と回復していた個体は以後の実験から除外した。仰臥位に再固定し頸部の創を再開放した。薬剤投与のために左総頸静脈に PE-10 カテーテル(427400, Becton Dickinson, New Jersey, USA)を留置し、後述の方法で各薬剤を投与した。虚血負荷開始 3 時間後に塞栓糸を慎重に抜去し再灌流した。閉創し腹臥位に再固定し脳血流が改善していることを確認した後に、マウスを覚醒させた。

### 3) 各薬剤治療群と薬剤投与方法

マウスを無作為に 3 群(非治療対照群 20 匹、rt-PA 治療群 30 匹、SMTP-7 治療群 15 匹)に分けた。SMTP-7 の血栓溶解力は rt-PA よりも微弱であるが<sup>11)</sup>、その抗炎症作用、抗酸化作用等により脳梗塞体積縮小作用は rt-PA より強力であることは前述の通りである<sup>11,13,15,16)</sup>。各薬剤を血栓溶解薬として使用した際の副作用である出血性変化に関して検討するため、各薬剤で同等の血栓溶解作用をもつように調整した投与量での比較ではなく、各薬剤で有効な脳梗塞縮小作用を示す投与量での検討を行うこととした。非治療対照群には、3 時間の一過性中大脳動脈閉塞後再灌流の 5 分前に 10 ml/kg の生理食塩水をボラスで静脈内投与した。rt-PA 治療群には、既出論文の rt-PA による血栓溶解療法の実験方法で汎用される投与方法に準じて rt-PA を投与した<sup>18)</sup>。すなわち、rt-PA (Grtpa, 128-61398-8, Mitsubishi Tanabe Pharma, Osaka, Japan)を水に溶解し 2 mg/ml とし 10 mg/kg を投与したが、再灌流 5 分前にまず 1 mg/kg をボラスで静脈内投与した後に残りの 9 mg/kg をシリンジポンプ(Baby Bee syringe drive, MD-1001, Bee Hive controller, MD-1020, Bioanalytical Systems, West Lafayette, USA)で 20 分間かけ持続静脈内投与した<sup>18)</sup>。SMTP-7 治療群には、

TMS (TMS Co., Ltd., Tokyo, Japan)より提供頂いた SMTP-7 (lot N01YH)を生理食塩水に 2 mg/ml に溶解し、10 mg/kg を非治療対照群と同様に再灌流 5 分前にボーラスで静脈内投与した。この用量は過去に報告された血栓性脳塞栓症マウスモデルでの至適用量である<sup>11)</sup>。非治療対照群および SMTP-7 群では rt-PA 群での 20 分間の持続静脈内投与を疑似するためにボーラス投与後も 20 分間カテーテルを静脈内に留置したまま麻酔を維持した。

#### 4) 2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド染色

再灌流 24 時間後まで生存したマウスのみで行った(各群 6 匹ずつ)。再灌流 24 時間後に脳サンプルを採取後、2 mm 幅の連続する 5 枚の冠状スライスを作成した。37℃ に加温した 1%の 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド(2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride: TTC) (17779-10XX10MLML-FF, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA)溶液を用いて 10 分間染色した。TTC はミトコンドリア内の水素で還元され赤色を呈する。よって脳梗塞巣は未染色部位として同定される<sup>25)</sup>。染色したスライスをデジタルカメラ(GR DIGITAL III, 173240, Ricoh, Tokyo, Japan)で撮影し、後述の出血性変化の重症度分類、梗塞体積、および脳浮腫指数の評価に用いた。

#### 5) 出血性変化の重症度分類

出血性変化の重症度は Kasahara らの方法に準じて前述の TTC 染色スライスで評価した。出血を認めないものを 0 点とし、以下のように出血の程度に準じて分類し 1 点から 4 点を与えた<sup>27-29)</sup>。出血性梗塞 1 型(HI-1 = 1 点)は梗塞巣の辺縁部に多い点状出血と定義される。出血性梗塞 2 型(HI-2 = 2 点)は梗塞巣内に見られるより明瞭な点状出血と定義される。脳実質内出血 1 型(PH-1 = 3 点)は梗塞巣の 30%未満を占める血腫と定義される。脳実質内出血 2 型(PH-2 = 4 点)は梗塞巣の 30%以上を占める血腫と定義される。点数が高値となるほど出血性変化は重症と評価される。各分類の代

表例を図 3A に示した。

## 6) 神経障害の重症度分類

神経障害は再灌流 24 時間後に 0 点から 6 点の神経障害の重症度分類で評価した(非治療対照群 20 匹、rt-PA 群 30 匹、SMTP-7 群 15 匹)。この重症度の分類は Forech らの方法に若干の修正したものを採用した(0 点=神経障害無し、1 点=右前肢の伸展不能、2 点=右側への回転、3 点=左側への転倒、4 点=“バレルロール”、5 点=自発運動不能、6 点=死亡)<sup>22,23)</sup>。点数が高値となるほど神経障害は重症と評価される。

## 7) 梗塞体積と脳浮腫指数

前述の通り脳梗塞巣は TTC 染色スライスの未染色部位として同定される。TTC 染色スライスの未染色領域を Image J (version 1.46r, National Institutes of Health) で計測し梗塞体積とした。脳浮腫指数も TTC 染色スライスから Garcia-Yebenes らの方法に準じて、 $(\text{虚血側体積}-\text{非虚血側体積})/\text{非虚血側体積} \times 100$  で計算した<sup>30)</sup>。

## 8) ゼラチンザイモグラフィー

MMP-9 活性の増幅による基底膜の破壊がもたらす血液脳関門の破綻が虚血再灌流後の出血性変化の一因であることは前述の通りである<sup>17-20)</sup>。そこで、MMP-9 の活性を検討する目的で再灌流 24 時間後の虚血側の脳半球サンプルを用いてゼラチンザイモグラフィーを行った。再灌流 24 時間後に生存したマウス(各群 3 匹ずつ)から脳サンプルを採取後、虚血側脳半球を蛋白分解酵素阻害剤カクテル(Complete, Mini, EDTA-free in EASYPack, 5892791, Roche, Basel, Switzerland)およびリン酸化阻害剤カクテル(PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail, 4906845, Roche, Basel, Switzerland)を含む 1 ml の溶解バッファー(N-PER Neuronal Protein Extraction Reagent, 87792, Thermo scientific, MA, USA)でホモジェナイズした。これを 4℃、 $10,000 \times g$  で 10 分間遠心した。続いて、Fujimura らの方法に準じて親和性カラムク



ロマトグラフィーによる精製を行った<sup>20)</sup>。上清をゼラチンセファロース 4B (17-0956-01, GE Healthcare, Uppsala, Sweden)で 4℃、持続攪拌下で 60 分間インキュベートした。続いて、サンプルを 4℃、500 × g で 2 分間遠心した。ペレットを洗浄バッファー(50 mM Tris-HCl [pH 7.6]、150 mM NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub>、0.05% BRIJ-35、0.02% NaN<sub>3</sub>)で洗浄した。2 回洗浄した後に、ペレットを溶出バッファー(50 mM Tris-HCl [pH 7.6]、150 mM NaCl、5 mM CaCl<sub>2</sub>、0.05% BRIJ-35、0.02% NaN<sub>3</sub>、10% dimethylsulfoxide)で 30 分間かけて再懸濁した。抽出したサンプルを用いてゼラチンザイモグラフィーキット(AK47, Primary Cell, Hokkaido, Japan)を使用し、マニュアル通りの手順でゼラチンザイモグラフィーを行った。画像は ChemiDoc MP ImageLab PC system (BioRad, CA, USA)で撮影し分析した。

## 9) 免疫組織化学

基底膜の破壊は血液脳関門の破綻に関与しており、その基底膜の主要構成成分である IV 型コラーゲンの破壊を評価する目的で免疫組織化学を行った。24 時間生存した 9 匹のマウスを用いた(各群 3 匹ずつ)。再灌流 24 時間後に摘出した脳サンプルを 4% パラフォルムアルデヒドで灌流固定した後に、O.C.T コンパウンド(Tissue-Tek, Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan)に包埋し凍結した。クライオスタット(Tissue-Tek Cryo3, Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan)にて 10 μm の凍結切片を作成し、以下の手順で免疫染色を行った。切片を 0.2% トライトン-X を含む 10% ウシ血清アルブミンにより 30 分間非特異的免疫反応のブロッキングを行った。1:400 希釈のラビット抗IV型コラーゲンポリクローナル抗体(ab6586, Abcam, Cambridge, UK)で 4℃にて 20 時間一次反応を行った。その後 1:200 希釈のビオチン標識抗ラビット免疫グロブリン抗体(BA-100, Vector Labs, CA, USA)で 30 分間二次反応を行い、洗浄後に VECTASTAIN Elite ABC Kit (Standard) (PK-6100, Vector Labs, CA, USA)でイ

ンキュベートし、diaminobenzidine (347-00904, DOJINDO, Kumamoto, Japan)で染色した。核染色はヘマトキシリンで行った。基底膜を形態学的に同定評価し、さらにIV型コラーゲン密度を Image J (version 1.46r, National Institutes of Health)を用いて半定量評価した。

## 10) 血液脳関門破綻の評価

血液脳関門の機能的破綻を静脈内投与したエバンスブルーの脳実質内への血管外漏出の程度から評価した。通常は血液脳関門の存在のために、正常脳では静脈内投与したエバンスブルーが脳実質内に漏出することはないが、脳梗塞内でかつ血液脳関門が破綻している部位では脳実質内にエバンスブルーが漏出することになる<sup>31,32)</sup>。

Tang らの方法に準じて 10 匹のマウス(非治療対照群 4 匹、rt-PA 治療群 3 匹、SMTP-7 治療群 3 匹)で評価した<sup>31,32)</sup>。再灌流 21 時間後に、麻酔下に 3 ml/kg の 2%エバンスブルーを左総頸静脈から投与した。投与 3 時間後に、経心臓的に生理食塩水で十分に灌流した後、脳サンプルを採取し大腦を虚血側半球と非虚血側半球に切離した。各半球を 1 ml の 50%トリクロロ酢酸でホモジェネートした。10,000 × g で 30 分間遠心後、上清を回収し、吸光度計(SpectraMax 190 Absorbance Microplate reader, Molecular Devices, CA, USA)でエバンスブルーの吸光度(620nm)を測定した。エバンスブルーの血管外漏出は、エバンスブルーの吸光輝度を虚血側の非虚血側に対する比(エバンスブルー血管外漏出指数)によって評価し、非特異的なエバンスブルーの漏出を補正した<sup>33)</sup>。

## 11) 統計学的検討

結果は平均 ± 標準偏差(S.D.)にて表し、有意水準は  $p < 0.05$  とした。脳梗塞体積および脳浮腫指数、ゼラチンザイモグラフィ、IV型コラーゲンの免疫組織化学、エバンスブルー血管外漏出指数における多群間解析は一元配置分散分析で検討後、

Tukey's post hoc 分析を用いて比較検定した。神経障害の重症度分類および出血性変化の重症度分類においては Kruskal-Wallis で検定後、Dunn's post hoc 分析を用いて比較検定した。再灌流 24 時間後の死亡率に関しては、 $\chi^2$  検定を行った。全ての統計学的検討は Graph Pad Prism 5.03 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA)を用いて行った。

## [5] 研究結果

### 1) 生理学的パラメーター

生理学的パラメーターを表 1 に示す。虚血前後および再灌流後の血圧、動脈血液ガスには各群間で有意差を認めなかった(各群 3 匹ずつ)。

### 2) rt-PA および SMTP-7 治療と出血性変化の関係

ワルファリン内服下に 3 時間の一過性中大脳動脈閉塞により虚血を負荷し、再灌流 24 時間後に生存していたマウスの脳サンプルで作成した TTC 染色スライスで出血性変化の重症度を検討した。また、再灌流後 24 時間以内に死亡したマウスでも出血の有無を調べたが、全例で図 3B に示したような巨大な血腫を認めた。各群マウスの代表例を図 3C に示した。本研究でのワルファリン投与下出血性梗塞モデルでの出血性変化の発生は非常に再現性が高く、再灌流 24 時間後に生存していたマウスでも全例で出血性変化を認めた(図 3D)。出血性変化の重症度分類の平均点は非治療対照群で  $2.3 \pm 1.4$  点、rt-PA 治療群で  $3.5 \pm 0.5$  点、および SMTP-7 治療群で  $1.3 \pm 0.5$  であった。再灌流 24 時間後の出血性変化は、rt-PA 治療群と比較すると SMTP-7 治療群で有意に軽度であった( $p < 0.05$ ) (図 3D)。また、SMTP-7 治療群での出血性変化の形態は特徴的であった。すなわち、SMTP-7 治療群での出血性変化は梗塞巣内の点状出血のみで脳実質内出血を呈することがなかった(図 3C, D)。また、SMTP-7 治療群では

非治療対照群よりも出血性変化が軽度となる傾向を示したが、統計学的有意差は認めなかった(図 3D)。一方で、rt-PA 治療群では非治療対照群よりも出血性変化が重度となる傾向を示したが、同様に統計学的有意差は認めなかった(図 3D)。

### 3) rt-PA および SMTP-7 治療と死亡率および神経障害の関係

死亡率および神経障害は再灌流 24 時間後に評価した。再灌流後 24 時間以内の死亡率は各群間で統計学的有意差を認めた( $p < 0.01$ ) (図 4A)。非治療対照群の 20% (4/20 匹) および rt-PA 治療群の 50% (15/30 匹) が再灌流 24 時間以内に死亡した(図 4A)。対照的に、SMTP-7 治療群のマウスは全例が再灌流 24 時間後にも生存していた(図 4A)。再灌流 24 時間後の神経障害も、非治療対照群( $1.1 \pm 0.3$ ,  $p < 0.01$ )および rt-PA 治療群( $4.5 \pm 1.7$ ,  $p < 0.001$ )と比較して SMTP-7 治療群( $1.1 \pm 0.3$ )では有意に軽度であった(図 4B)。また、rt-PA 治療群の神経障害は非治療対照群よりも有意に重度であった( $p < 0.05$ ) (図 4B)。

### 4) rt-PA および SMTP-7 治療と脳梗塞体積および脳浮腫の関係

3 時間の一過性中大脳動脈閉塞後の再灌流 24 時間後に生存していたマウスのみを用いて、脳梗塞体積および脳浮腫指数を検討した。各群 6 匹ずつで評価した。脳梗塞体積および脳浮腫指数には、各群間で有意差を認めなかった(図 5A, B)。しかしながら、脳梗塞体積は SMTP-7 治療群で小さい傾向を認め(図 5A)、また、脳浮腫に関しても SMTP-7 治療群で軽度となる傾向を認めた(図 5B)。

### 5) rt-PA および SMTP-7 治療が MMP-9 活性化を介した血液脳関門破綻に与える影響

MMP-9 活性の増幅による基底膜の破壊がもたらす血液脳関門の破綻が虚血再灌流後の出血性変化の一因であることから<sup>21,26-28)</sup>、rt-PA および SMTP-7 による治療が MMP-9 の活性、基底膜の破壊、および血液脳関門の機能的破綻に与える影響を検討

した。

pro-MMP-9 および MMP-9 の活性をゼラチンザイモグラフィーにて評価した(図 6A-C)。再灌流 24 時間後に生存していたマウスの脳サンプルで行った。pro-MMP-9 の活性は非治療対照群( $393.4 \pm 63.1$ )と rt-PA 治療群( $512.3 \pm 92.0$ )の間に有意差を認めなかった(図 6B)。一方で、MMP-9 の活性は非治療対照群( $10.4 \pm 1.0$ )と比較して rt-PA 治療群( $15.8 \pm 1.3$ )で有意に高値であった( $p < 0.05$ ) (図 6C)。また、SMTP-7 治療群の pro-MMP-9 ( $88.9 \pm 34.2$ )および MMP-9 ( $5.0 \pm 1.6$ )の活性は、非治療対照群 (pro-MMP-9,  $p < 0.01$ ; MMP-9,  $p < 0.05$ )および rt-PA 治療群(pro-MMP-9,  $p < 0.01$ ; MMP-9,  $p < 0.001$ )よりも有意に低値であった(図 6B,C)。

IV型コラーゲンは基底膜の主要構成成分であり、その破壊を免疫組織化学により検討した。図 7A に非治療対照群、rt-PA 治療群、および SMTP-7 治療群の代表例を示した。非治療対照群および rt-PA 治療群では基底膜が形態学的に破壊されていた、しかしその程度は rt-PA 治療群で高度であった(図 7A)。一方で、SMTP-7 治療群での基底膜破壊の程度は軽度であった(図 7A)。IV 型コラーゲン密度の半定量評価においても SMTP-7 治療群( $0.061 \pm 0.002$ )の基底膜破壊が rt-PA 治療群( $0.034 \pm 0.004$ )のそれよりも有意に軽度であることが示された( $p < 0.001$ ) (図 7B)。

虚血再灌流 24 時間後の血液脳関門の機能的破綻を、静脈内投与されたエバンスブルーの脳実質内への漏出の程度で評価した。各群の代表例を図 8A 示した。非特異的なエバンスブルーの漏出を補正するために、虚血側の非虚血側に対する比 (エバンスブルー血管外漏出指数) を採用した。rt-PA 治療群( $4.1 \pm 0.4$ )でのエバンスブルーの漏出は非治療対照群( $2.1 \pm 0.9$ ,  $p < 0.05$ )および SMTP-7 治療群( $1.5 \pm 0.3$ ,  $p < 0.01$ )よりも有意に高度であった(図 8B)。

## [6] 考察

本研究では、SMTP-7 が、ワルファリン内服下マウス一過性中大脳動脈閉塞後の出血性変化を抑制し、機能および生命予後を改善することが示された。MMP-9 活性を抑制し基底膜の破壊を軽減し、血液脳関門破綻に対し抑制的に働くことが、SMTP-7 が出血性変化を減少させた機序の 1 つと示唆された。

高い致死率が一因となり、ワルファリン投与下の虚血性脳卒中における血栓溶解療法を検討した研究は少ない<sup>22,34)</sup>。前述の通り一般的に汎用されているマウス一過性中大脳動脈閉塞モデルでは後大脳動脈領域も梗塞巣に含まれてしまうことにより虚血負荷が高度となるため<sup>25,35)</sup>、ワルファリン投与下においては脳虚血が長時間に及ぶと、重度の脳梗塞、脳浮腫、および出血性変化によりほぼ全例が 24 時間以内に死亡することを確認した(データ記載無し)。よって、一般的なマウス一過性中大脳動脈閉塞モデルは高い致死率により、本研究では使用できないと判断した。そこで、過去に報告された後大脳動脈領域を梗塞巣に含まないマウス一過性中大脳動脈閉塞モデル<sup>25)</sup>を使用することにより、高い生存率を有するワルファリン投与下出血性梗塞モデルを作成することが可能であった。

本研究では、ワルファリンを投与し PT-INR が延長した状況においては、SMTP-7 が rt-PA と比較して安全性の高い血栓溶解薬であることが示唆された。しかし、本研究では非治療対照群と rt-PA 治療群の間には出血性変化の重症度に有意差を認めず、このことは過去の報告と異なる<sup>22,29,36,37)</sup>。これは出血性変化の評価方法に起因する可能性がある。すなわち、出血性変化の評価は虚血再灌流 24 時間後に生存し得たマウスのみを対象としたことから、顕著な出血を呈し 24 時間以内に死亡したマウスが除外されたため、より死亡率の高い rt-PA 治療群では出血性変化が過小評価された可能性がある。よって、24 時間以内の死亡を最重症の神経障害と定義した神経障害の重

症度が、薬剤の治療効果をより正確に反映していると考えられる。実際に、神経障害の程度は rt-PA 治療群で非治療対照群よりも有意に重度であった。また一方で、本研究では過去の報告<sup>11,13,15,16)</sup>とは異なり、SMTP-7 は脳梗塞体積を縮小する傾向にあったが有意な縮小を示さなかった。これは、3 時間という長時間の脳虚血による内因性 t-PA の放出とその細胞毒性に起因すると考えられる<sup>38)</sup>。Wang らは、3 時間の一過性中大脳動脈閉塞モデルでは 2 時間のそれに比して有意に内因性 t-PA が増加することを報告している<sup>38)</sup>。すなわち、2 時間の一過性中大脳動脈閉塞後の rt-PA 投与ではその細胞毒性により脳梗塞体積が増大する一方で、3 時間の一過性中大脳動脈閉塞後の rt-PA 投与では内因性 t-PA による天井効果により脳梗塞体積の増大は認めなかった<sup>38)</sup>。この内因性 t-PA 放出による細胞毒性により SMTP-7 の神経保護作用が相殺されたものと考えられる。

rt-PA 静脈内投与は虚血性脳卒中における超急性期治療として有用であるが、その治療効果は出血性合併症により制限されてしまう<sup>3-5)</sup>。rt-PA 静脈内投与による血栓溶解療法がもたらす副作用は、再灌流障害のみでなく rt-PA 自身の細胞毒性にも起因することは前述の通りである<sup>38,39)</sup>。Wang らは、血管内皮において rt-PA により MMP-9 が活性化し、基底膜の破壊、延いては血液脳関門の破綻がもたらされることを報告した<sup>40)</sup>。さらに、この t-PA - MMP-9 経路の活性化による血液脳関門の破綻が虚血再灌流後の出血性変化の一因となることも報告されている<sup>18,19,41)</sup>。よって、rt-PA は急性期虚血性脳卒中の治療において重要な薬剤である一方で、危険な薬剤でもある。

MMP-9 活性化が血液脳関門の破綻をもたらし出血性変化を起こすことは前述の通りであるが<sup>18,19,41)</sup>、虚血再灌流後における血液脳関門の破壊は主に基底膜で生じる<sup>24,42)</sup>。本研究では、ゼラチンザイモグラフィにより、SMTP-7 治療群において pro-MMP-9 および MMP-9 の活性が非治療対照群よりも有意に低値であることを示した。すなわ

ち、SMTP-7 はワルファリン投与下マウスにおいて虚血再灌流後による MMP-9 活性の増強を抑制することが示唆された。この結果は、SMTP-7 が血液脳関門の機械的破壊を示す基底膜の破壊を抑制し、かつ機能的破綻を示すエバンスブルーの脳実質内への漏出も抑制したという結果にも矛盾しない。これらの結果から、SMTP-7 がワルファリン投与下での脳虚血再灌流後において血液脳関門破綻に対し抑制的に働くことが示唆され、これが出血性変化の抑制に寄与したと考えられた。一方、rt-PA 治療群でのエバンスブルーの血管外漏出は有意に高度であり、この脳血液関門の破綻が rt-PA による出血性変化の増悪をもたらしたと考察される。

さらに、ワルファリン内服下での虚血再灌流後に SMTP-7 が MMP-9 活性を抑制し出血性変化を軽減した機序を以下のように考察した。まず、SMTP-7 はプラスミノゲン・アクティベータに触媒されるプラスミノゲンの活性化を約 100 倍増強する一方で、内因性 t-PA の酵素活性自体にはまったく影響を与えないという点である<sup>12)</sup>。すなわち、SMTP-7 は出血性変化の重要な一因である t-PA・MMP-9 経路を賦活化することがない。次に、SMTP-7 が抗炎症作用と抗酸化作用を有するという点である<sup>11,13,14)</sup>。虚血再灌流とそれによるケモカイン反応は虚血脳組織に炎症細胞を誘導し、その炎症細胞は MMP-9 等の蛋白分解酵素を放出し血液脳関門を破壊する<sup>43)</sup>。さらには、炎症細胞は脳組織で活性酸素種を産生し酸化ストレスをもたらす<sup>44)</sup>。SMTP-7 は IL-1 $\beta$  による VCAM-1 の発現、活性酸素種の産生、および白血球の内皮細胞への接着を直接抑制することが知られている<sup>13)</sup>。以上 2 点により、SMTP-7 は MMP-9 活性を抑制し血液脳関門破綻に抑制的に働くことにより出血性変化を抑制したと考えられる。最後に、SMTP-7 の血栓溶解作用が血栓局所的であり全身性の血栓溶解作用には影響しないという点である<sup>10,11)</sup>。SMTP-7 の作用は、プラスミノゲン・アクティベータによるプラスミノゲンのプラスミンへの変化の促進であり、その血栓溶解作用はプラスミノ



ゲン・アクティベータの存在下、すなわち血栓または塞栓上でしか生じない<sup>10,11)</sup>。よって、SMTP-7は全身性の出血傾向を引き起こすことがなく出血性変化の増悪をもたらさなかったと考えられる。

本研究の問題点としては、まず出血性変化の重症度、脳梗塞体積、脳浮腫指数、ゼラチンザイモグラフィ、免疫組織化学、およびエバンスブルー血管外漏出指数に関しては生存したマウスのみで評価した点が挙げられる。これは既出論文の方法に準じて行ったが<sup>22-24)</sup>、本研究では各群で死亡率が異なっており評価条件が異なるため、全例が生存している時点で sacrifice し条件を一致させて検討するのが理想的であった。前述の通り、過去の報告と異なり出血性変化の重症度において非治療対照群と rt-PA 治療群の間で有意差を認めなかったのはこのためと考えられる。しかし、本研究においては、重症の出血性変化で死亡するマウスは再灌流後間もなくの数時間で死亡することが多かったことだった。虚血再灌流数時間後では MMP-9 の活性化および基底膜の破壊、血液脳関門の破綻、脳梗塞、脳浮腫等はまだ完成しておらず評価不可能であり、本研究においては全例が生存している時点での評価は現実には困難であった。また、生存したマウスのみで評価を行うことは、薬剤の副作用である出血性変化を検討する上では死亡率の低い SMTP-7 の安全性をより強調することになるため、本研究では許容とした。もう一点は検体数が少数であったことである。必ずしも個体間のばらつきを排除するために十分な検体数であったとは言えない。よって本来であれば、事前にパワーアナリシスを行い必要なサンプルサイズを検討するべきであった。

## [7] 結論

本研究により、SMTP-7は高度の PT-INR 延長を伴ったワルファリン投与下マウス一過性中大脳動脈閉塞モデルでの出血性変化を抑制し、機能および生命予後を改善す

ることが示された。一方で、rt-PA は重度の出血性変化をもたらす予後を悪化させることが示唆された。これらの結果から、SMTP-7 は rt-PA 静脈内投与禁忌のワルファリン内服患者においても安全に使用できる血栓溶解薬になり得ると考えられる。

## 謝辞

今回の研究ならびに博士論文作成に際し、多大な御指導と御協力を頂いた新妻邦泰先生、清水宏明先生、藤村幹先生、蓮見恵司先生、および富永悌二教授に対し、深く感謝を申し上げます。

[参考文献]

1. Adams HP, Jr., del Zoppo G, Alberts MJ, et al: Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: A guideline from the american heart association/american stroke association stroke council, clinical cardiology council, cardiovascular radiology and intervention council, and the atherosclerotic peripheral vascular disease and quality of care outcomes in research interdisciplinary working groups: The american academy of neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Circulation* 115:e478-534, 2007
2. Del Zoppo GJ, Saver JL, Jauch EC, et al: Expansion of the time window for treatment of acute ischemic stroke with intravenous tissue plasminogen activator: A science advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 40:2945-2948, 2009
3. Group TNIoNDaSr-PSS: Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 333:1581-1587, 1995
4. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, et al: Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 274:1017-1025, 1995
5. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, et al: Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian

- Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 352:1245-1251, 1998
6. Albers GW, Bates VE, Clark WM, et al: Intravenous tissue-type plasminogen activator for treatment of acute stroke: The Standard Treatment with Alteplase to Reverse Stroke (STARS) study. *JAMA* 283:1145-1150, 2000
  7. Shinohara Y. Japanese guidelines for the management of stroke 2009 : Important revised points necessary for the neurologist, *Rinsho shinkeigaku* = *Clinical neurology* 50:808-811, 2010
  8. Ohsawa M, Okayama A, Sakata K et al. Rapid increase in estimated number of persons with atrial fibrillation in japan: An analysis from national surveys on cardiovascular diseases in 1980, 1990 and 2000. *Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association* 15:194-196, 2005
  9. Hu W OS, Hasumi K. Activation of fibrinolysis by SMTP-7 and -8, novel staplabin analogs with a pseudosymmetric structure. *J Antibiot (Tokyo)* 53:241-247, 2000
  10. Hasumi K, Yamamichi S, Harada T. Small-molecule modulators of zymogen activation in the fibrinolytic and coagulation systems. *FEBS J* 277:3675-3687, 2010
  11. Shibata K, Hashimoto T, Nobe K, et al: A novel finding of a low-molecular-weight compound, SMTP-7, having thrombolytic and anti-inflammatory effects in cerebral infarction of mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 382:245-253, 2010

12. Hu W, Narasaki R, Nishimura N, et al: SMTP (Stachybotrys Microspora Triprenyl Phenol) enhances clot clearance in a pulmonary embolism model in rats. *Thromb J* 10:2, 2012
13. Miyazaki T, Kimura Y, Ohata H, et al: Distinct effects of tissue-type plasminogen activator and SMTP-7 on cerebrovascular inflammation following thrombolytic reperfusion. *Stroke* 42:1097-1104, 2011
14. Shibata K, Hashimoto T, Nobe K, et al: Neuroprotective mechanisms of SMTP-7 in cerebral infarction model in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 384:103-108, 2011
15. Hashimoto T, Shibata K, Nobe K, et al: A novel embolic model of cerebral infarction and evaluation of Stachybotrys Microspora Triprenyl Phenol-7 (SMTP-7), a novel fungal triprenyl phenol metabolite. *J Pharmacol Sci* 114:41-49, 2010
16. Akamatsu Y, Saito A, Fujimura M, et al: Stachybotrys microspora triprenyl phenol-7, a novel fibrinolytic agent, suppresses superoxide production, matrix metalloproteinase-9 expression, and thereby attenuates ischemia/reperfusion injury in rat brain. *Neurosci Lett* 503:110-114, 2011
17. Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, et al: Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1393-1400, 2001
18. Sumii T. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal

- ischemia in rats. *Stroke* 33:831-836, 2002
19. Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtpa-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 34:2025-2030, 2003
  20. Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, et al: Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood–brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res* 842:92-100, 1999
  21. Foerch C, Arai K, Jin G, et al: Experimental model of warfarin-associated intracerebral hemorrhage. *Stroke* 39:3397-3404, 2008
  22. Waltraud Pfeilschifter DS, Josef Pfeilschifter, Helmuth Steinmetz, et al: Warfarin anticoagulation exacerbates the risk of hemorrhagic transformation after rt-PA treatment in experimental stroke: Therapeutic potential of PCC. *PloS one* 6:e26087, 2011
  23. Pfeilschifter W, Spitzer D, Czech-Zechmeister B, et al: Increased risk of hemorrhagic transformation in ischemic stroke occurring during warfarin anticoagulation: An experimental study in mice. *Stroke* 42:1116-1121, 2011
  24. Yamashita T, Kamiya T, Deguchi K, et al: Dissociation and protection of the neurovascular unit after thrombolysis and reperfusion in ischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:715-725, 2009
  25. Akamatsu Y, Shimizu H, Saito A, et al: Consistent focal cerebral ischemia without posterior cerebral artery occlusion and its real-time monitoring in an intraluminal suture model in mice. *J Neurosurg* 116:657-664, 2012

26. Forrester KR, Stewart C, Tulip J, et al: Comparison of laser speckle and laser doppler perfusion imaging: Measurement in human skin and rabbit articular tissue. *Med Biol Eng Comput* 40:687-697, 2002
27. Aronowski J, Strong R, Shirzadi A, et al: Ethanol plus caffeine (caffeinol) for treatment of ischemic stroke: Preclinical experience. *Stroke* 34:1246-1251, 2003
28. Berger C, Fiorelli M, Steiner T, et al: Hemorrhagic transformation of ischemic brain tissue: Asymptomatic or symptomatic? *Stroke* 32:1330-1335, 2001
29. Kasahara Y, Nakagomi T, Matsuyama T, et al: Cilostazol reduces the risk of hemorrhagic infarction after administration of tissue-type plasminogen activator in a murine stroke model. *Stroke* 43:499-506, 2012
30. Garcia-Yebenes I, Sobrado M, Zarruk JG, et al: A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke* 42:196-203, 2011
31. Li M, Zhang Z, Sun W, et al: 17beta-estradiol attenuates breakdown of blood-brain barrier and hemorrhagic transformation induced by tissue plasminogen activator in cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 44:277-283, 2011
32. Tang J, Li YJ, Mu J, et al: Albumin ameliorates tissue plasminogen activator-mediated blood-brain barrier permeability and ischemic brain injury in rats. *Neurol Res* 31:189-194, 2009
33. Chen CH, Toung TJ, Sapirstein A, et al: Effect of duration of osmotherapy

- on blood-brain barrier disruption and regional cerebral edema after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:951-958, 2006
34. Pfeilschifter W, Bohmann F, Baumgarten P, et al: Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator under dabigatran anticoagulation in experimental stroke. *Ann Neurol* 71:624-633, 2012
  35. Clark WM, Lessov NS, Dixon MP, et al: Monofilament intraluminal middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Neurol Res* 19:641-648, 1997
  36. Cheng T, Petraglia AL, Li Z, et al. Activated protein c inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat Med* 12:1278-1285, 2006
  37. Ishiguro M, Mishiro K, Fujiwara Y, et al. Phosphodiesterase-iii inhibitor prevents hemorrhagic transformation induced by focal cerebral ischemia in mice treated with tpa. *PloS one* 5:e15178, 2010
  38. Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, et al: Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tpa-deficient mice. *Nat Med* 4:228-231, 1998
  39. Hacke W, Brott T, Caplan L, et al: Thrombolysis in acute ischemic stroke: Controlled trials and clinical experience. *Neurology* 53:S3-14, 1999
  40. Wang X, Lee SR, Arai K, et al. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med* 9:1313-1317, 2003
  41. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA, et al: Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage



- after thromboembolic stroke. *Stroke* 31:3034-3040, 2000
42. Tagaya M, Liu KF, Copeland B, et al: DNA scission after focal brain ischemia. Temporal differences in two species. *Stroke* 28:1245-1254, 1997  
41. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354:610-621, 2006
43. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354:610-621, 2006
44. Kilic E, Kilic U, Matter CM, et al: Aggravation of focal cerebral ischemia by tissue plasminogen activator is reversed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor but does not depend on endothelial nitric oxide synthase. *Stroke* 36:332-336, 2005

表 1

表 1 生理学的パラメーター

	<i>MABP (mmHg)</i>	<i>pH</i>	<i>PaCO<sub>2</sub> (mmHg)</i>	<i>PaO<sub>2</sub> (mmHg)</i>
<b>虚血前</b>				
非治療対照群	54.0 ± 2.2	7.38 ± 0.02	30.6 ± 4.5	128.0 ± 8.5
rt-PA 治療群	55.3 ± 0.9	7.37 ± 0.03	34.1 ± 1.2	123.3 ± 8.4
SMTP-7 治療群	55.7 ± 2.6	7.38 ± 0.02	32.4 ± 1.3	133.3 ± 25.4
<b>虚血後</b>				
非治療対照群	52.3 ± 1.2	7.36 ± 0.11	32.9 ± 4.3	127.0 ± 11.8
rt-PA 治療群	55.0 ± 2.4	7.26 ± 0.03	34.6 ± 1.3	131.0 ± 15.1
SMTP-7 治療群	56.0 ± 0.8	7.32 ± 0.03	35.0 ± 2.3	137.3 ± 26.8
<b>再灌流後</b>				
非治療対照群	56.7 ± 2.6	7.32 ± 0.04	37.4 ± 4.0	125.3 ± 7.3
rt-PA 治療群	56.0 ± 2.4	7.30 ± 0.05	36.9 ± 1.3	129.7 ± 10.9
SMTP-7 治療群	55.7 ± 1.2	7.32 ± 0.08	35.6 ± 1.7	127.3 ± 10.7

MABP は平均血圧を表す

## 【図説明文】

### 図 1

本研究全体のタイムコース。各マウスを非治療対照群、rt-PA 治療群、および SMTP-7 治療群の 3 群に割り当てた。虚血負荷に先立ちマウスに 24 時間ワルファリンを投与した。24 時間のワルファリン投与後に血管内塞栓系による一過性中大脳動脈閉塞を行い 3 時間の虚血を負荷した。再灌流 5 分前より各薬剤を投与した。再灌流後は水、食餌を自由に与えた保温環境下で生存させ再灌流 24 時間後までの死亡率を評価した。再灌流 24 時間後まで生存したマウスの機能評価を行った後に sacrifice し、脳梗塞体積と脳浮腫の評価、ゼラチンザイモグラフィ、免疫組織化学、および血機能関門の評価を行った。

### 図 2

一過性中大脳動脈モデルの作成。(A) マウス前脳背側表面での前大脳動脈、中大脳動脈、および後大脳動脈の血管支配領域。(B) 虚血負荷前のマウス前脳背側表面の脳血流画像。(C) マウスを仰臥位とし頸部を伸展した。(D) 顕微鏡下に頸部を正中切開し総頸動脈、外頸動脈、および内頸動脈を各々露出した。(E) 左外頸動脈より血管内塞栓系を左内頸動脈に誘導し左中大脳動脈を血管内より閉塞した。(F) 虚血負荷中のマウス前脳背側表面の脳血流画像。左中大脳動脈領域のみ血流が低下している。(G) 後大脳動脈領域まで虚血に陥っているマウスでの前脳背側表面の脳血流画像。

### 図 3

再灌流 24 時間後の出血性変化の重症度の検討。各群 6 匹ずつで検討した。(A) 出

血性変化の重症度。以下の 5 つに分類した：出血無し(0 点)、出血性梗塞 1 型(HI-1 = 1 点)、出血性梗塞 2 型(HI-2 = 2 点)、脳実質内出血 1 型(PH-1 = 3 点)、脳実質内出血 2 型(PH-2 = 4 点)。本研究では出血なし(0 点)は認めなかった。(B) 24 時間以内に死亡したマウスの代表例。全例で巨大な血腫を認めた。(C)各群のマウスの代表例。(D) SMTP-7 治療群の出血性変化は rt-PA 治療群と比較して有意に軽度であった(\* $p < 0.05$ )。さらに、SMTP-7 治療群では非治療対照群よりも軽度となる傾向を示したが、統計学的有意差は認めなかった。一方で、rt-PA 治療群では非治療対照群よりも重度となる傾向を示したが、同様に統計学的有意差は認めなかった。Vehicle は非治療対照群、rt-PA は rt-PA 治療群、SMTP-7 は SMTP-7 治療群を表す。

#### 図 4

再灌流 24 時間後の死亡率および神経障害の重症度の検討。非治療対照群 20 匹、rt-PA 治療群 30 匹、および SMTP-7 治療群 15 匹で検討した。(A) 24 時間後の死亡率は 3 群間で有意差を認めた(\*\* $p < 0.01$ )。非治療対照群の 20%および rt-PA 治療群の 50%が再灌流 24 時間以内に死亡した。一方で、SMTP-7 治療群は全例が再灌流 24 時間後も生存した。(B) 神経障害の重症度。障害無し(0 点)から死亡(6 点)までの 7 段階に分類した。再灌流 24 時間後の神経障害は rt-PA 治療群で非治療対照群よりも有意に重症であった(\* $p < 0.05$ )。また、非治療対照群(\*\* $p < 0.01$ )および rt-PA 治療群(\*\* $p < 0.001$ )と比較して、SMTP-7 治療群では神経障害が有意に軽度であった。Vehicle は非治療対照群、rt-PA は rt-PA 治療群、SMTP-7 は SMTP-7 治療群を表す。

#### 図 5

再灌流 24 時間後の脳梗塞体積および脳浮腫の検討。各群 6 匹ずつで検討した。(A)

再灌流 24 時間後の脳梗塞体積。SMTP-7 治療群で脳梗塞体積は小さくなる傾向を示したが、統計学的有意差を認めなかった。(B) 脳浮腫の検討。脳浮腫の程度は脳浮腫指数(虚血側体積-非虚血側体積/非虚血側体積)×100 で評価した。再灌流 24 時間後の脳浮腫は SMTP-7 治療群で軽度となる傾向を示したが、統計学的有意差を認めなかった。Vehicle は非治療対照群、rt-PA は rt-PA 治療群、SMTP-7 は SMTP-7 治療群を表す。

#### 図 6

再灌流 24 時間後の pro-matrix metalloproteinase (pro-MMP-9)および MMP-9 活性の検討。各群 3 匹ずつで検討した。(A) ゼラチンザイモグラフィ。pro-MMP-9 および MMP-9 は各々 105 kDa と 97 kDa に検出された。(B) 非治療対照群(\*\*p < 0.01)および rt-PA 治療群(\*\*p < 0.01)と比較して、SMTP-7 治療群の再灌流 24 時間後の pro-MMP-9 活性は有意に低値であった。(C) rt-PA 治療群の再灌流 24 時間後の MMP-9 活性は非治療対照群よりも有意に高値であった(\*p < 0.05)。一方で、SMTP-7 治療群の MMP-9 活性は非治療対照群(\*p < 0.05)および rt-PA 治療群(\*\*p < 0.001)よりも有意に低値であった。Vehicle は非治療対照群、rt-PA は rt-PA 治療群、SMTP-7 は SMTP-7 治療群、OD は optical density を表す。

#### 図 7

再灌流 24 時間後の IV 型コラーゲンの免疫組織化学。各群 3 匹ずつで検討した。(A) IV 型コラーゲンの免疫組織化学の代表例。IV 型コラーゲンは基底膜の主要構成成分であり、基底膜を形態学的に検討すると、非治療対照群および rt-PA 治療群で高度に破壊されていた。一方で、SMTP-7 治療群での基底膜の形態学的な破壊は軽度であった。

上段は低倍率、下段は高倍率を示す。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を表す。(B) IV 型コラーゲン密度の半定量評価。rt-PA 治療群の IV 型コラーゲン密度は非治療対照群よりも低値であった(\* $p < 0.05$ )。SMTP-7 治療群の IV 型コラーゲン密度は非治療対照群(\* $p < 0.05$ )および rt-PA 治療群(\*\* $p < 0.001$ )よりも有意に高値であった。Vehicle は非治療対照群、rt-PA は rt-PA 治療群、SMTP-7 は SMTP-7 治療群を表す。

## 図 8

再灌流 24 時間後の血液脳関門の機能的破綻の検討。非治療対照群 4 匹、rt-PA 治療群 3 匹、および SMTP-7 治療群 3 匹で検討した。(A)エバンスブルーの脳実質内への漏出。血液脳関門の機能的破綻評価する目的に静脈内投与したエバンスブルーの脳実質内への漏出を評価した。肉眼的に SMTP-7 治療群では漏出が軽度であった。(B)エバンスブルー血管外漏出指数を用いた半定量評価。rt-PA 治療群でのエバンスブルーの血管外漏出は非治療対照群よりも有意に高度であった(\* $p < 0.05$ )。一方で、SMTP-7 治療群での漏出は rt-PA 治療群よりも有意に軽度であった(\*\* $p < 0.01$ )。Vehicle は非治療対照群、rt-PA は rt-PA 治療群、SMTP-7 は SMTP-7 治療群を表す。

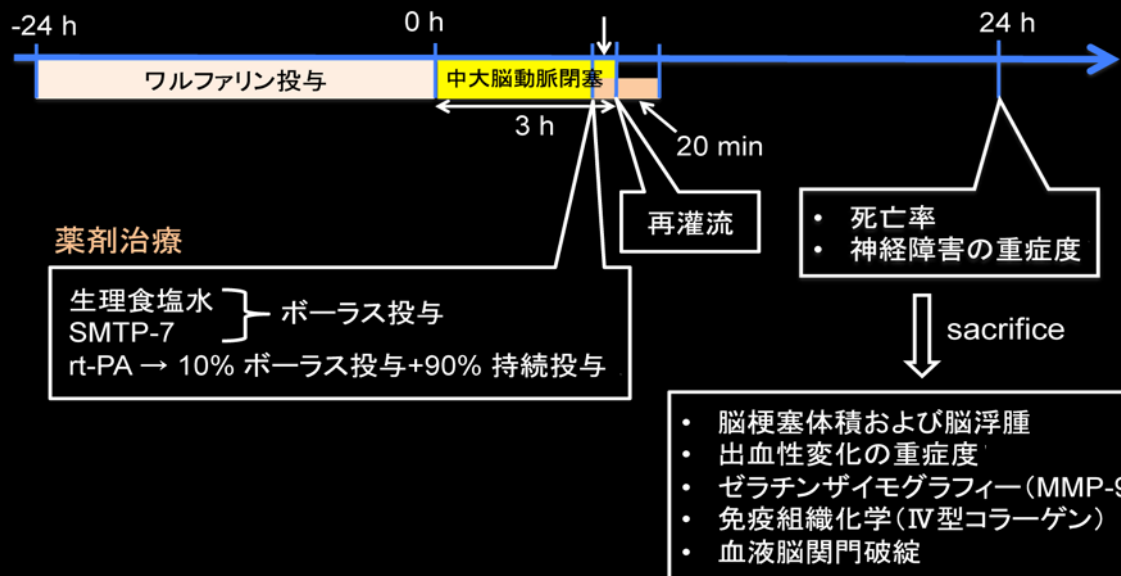


図 1

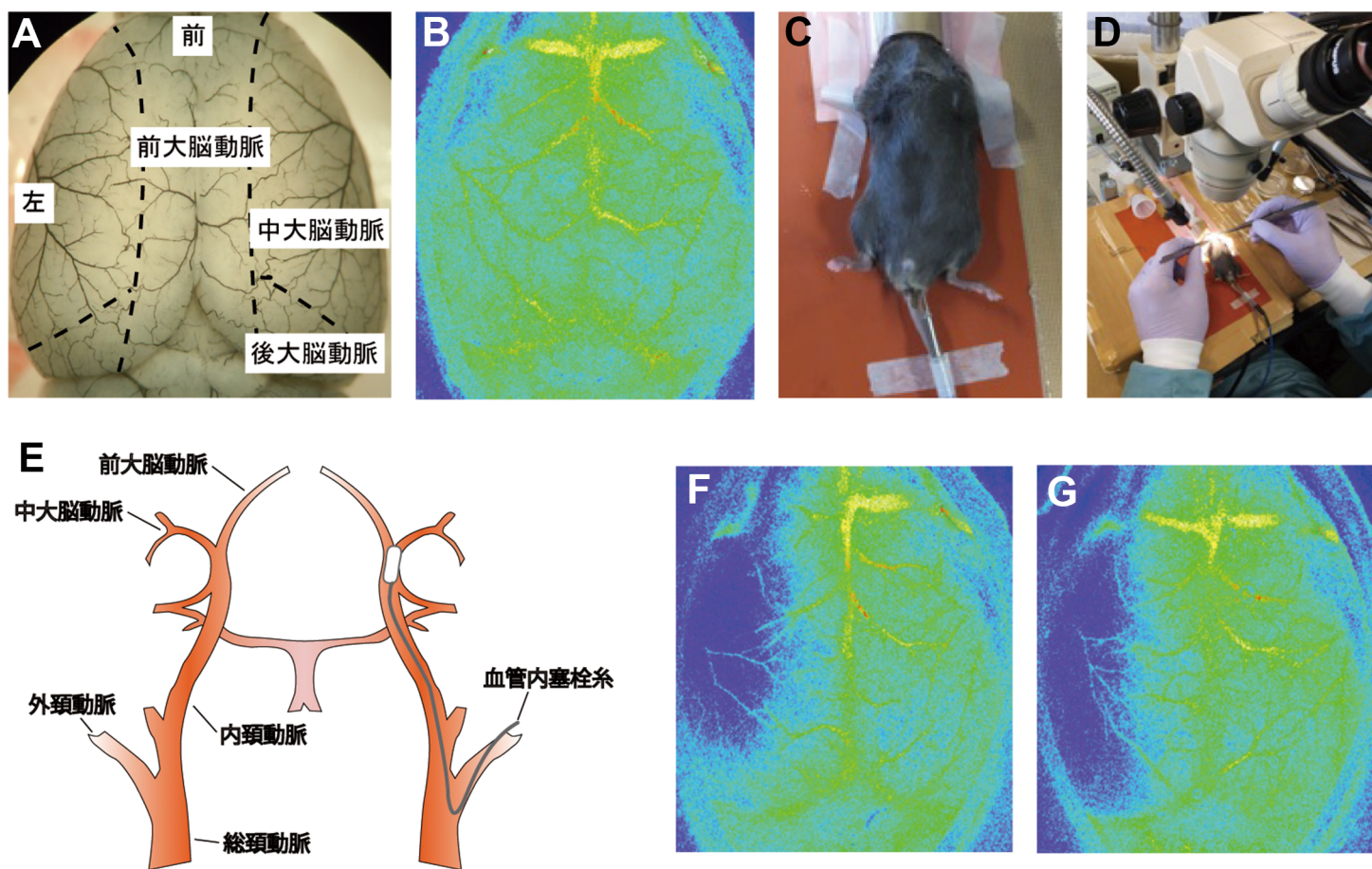
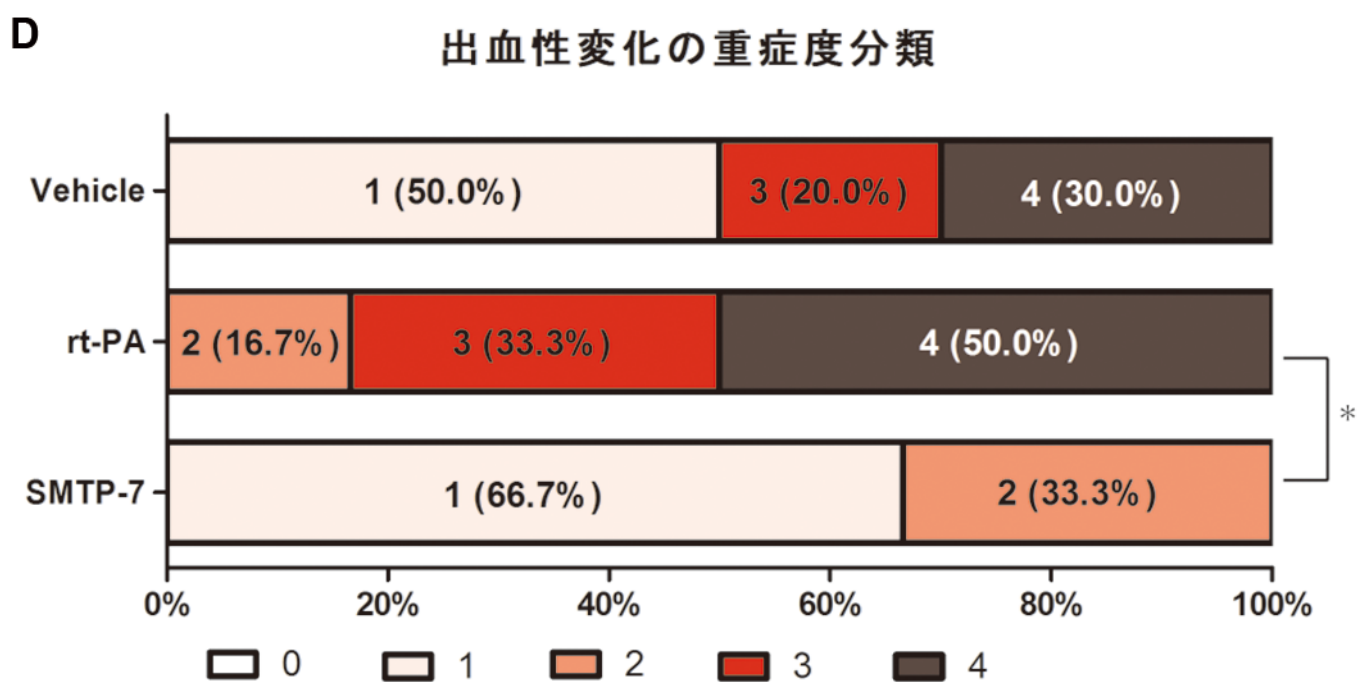
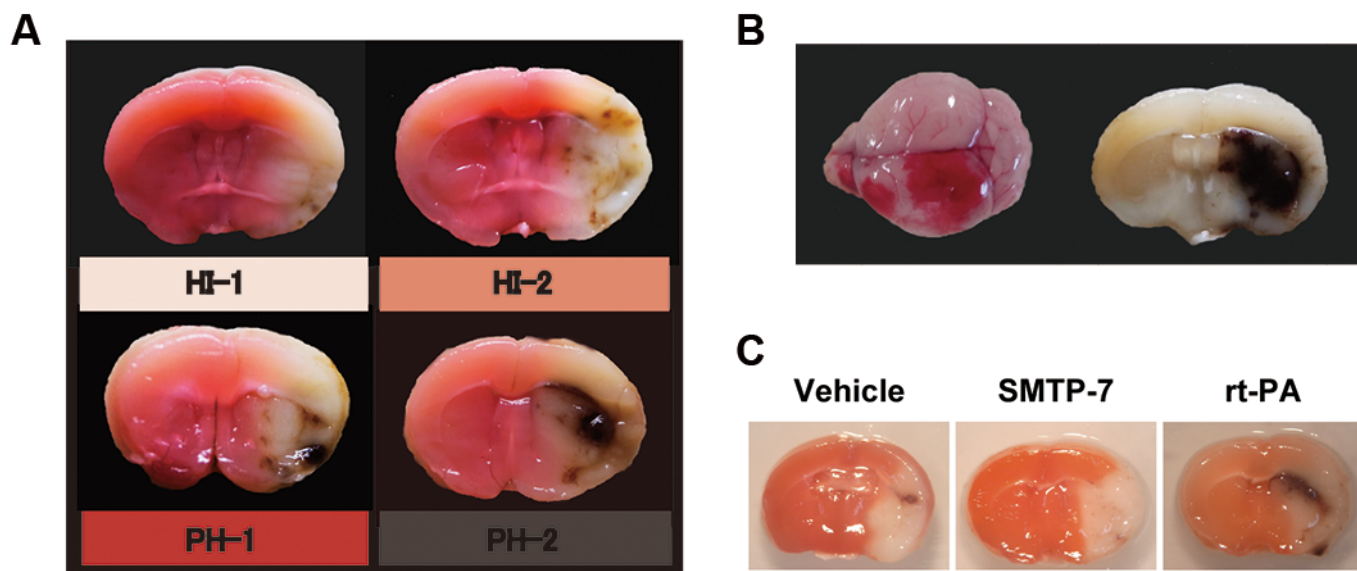


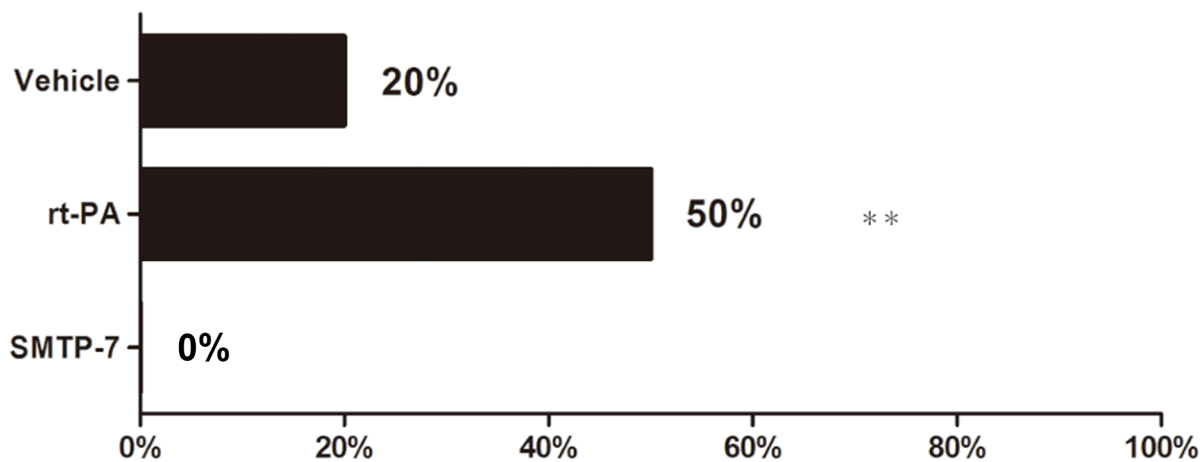
図2





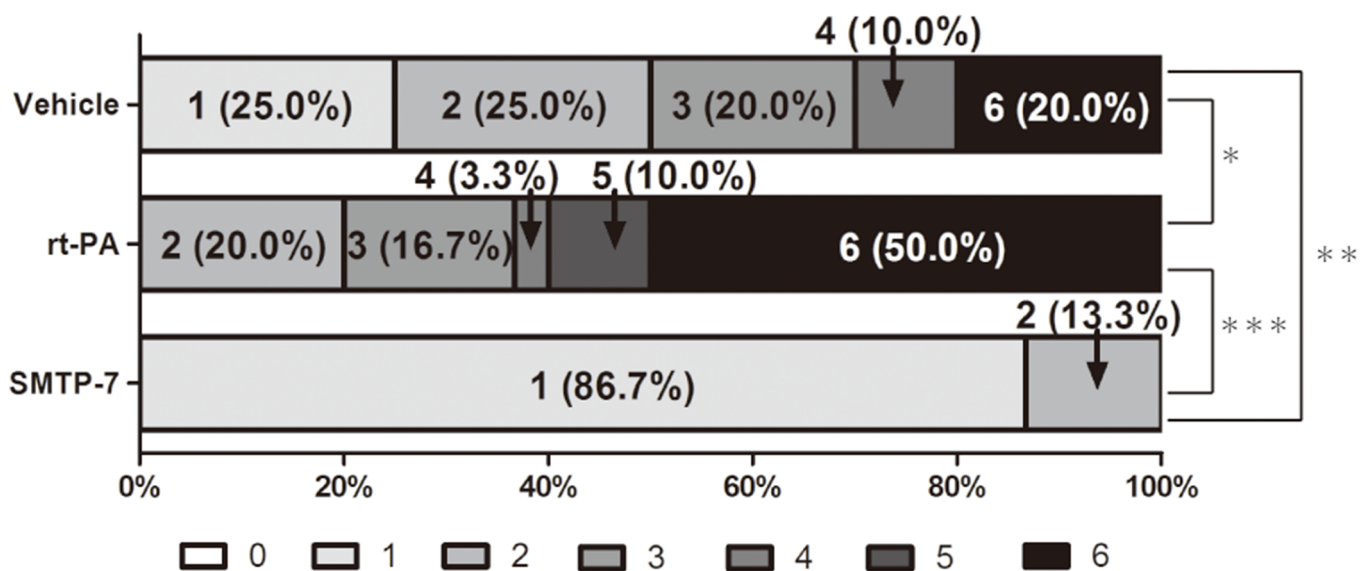
**A**

死亡率



**B**

神経障害の重症度分類



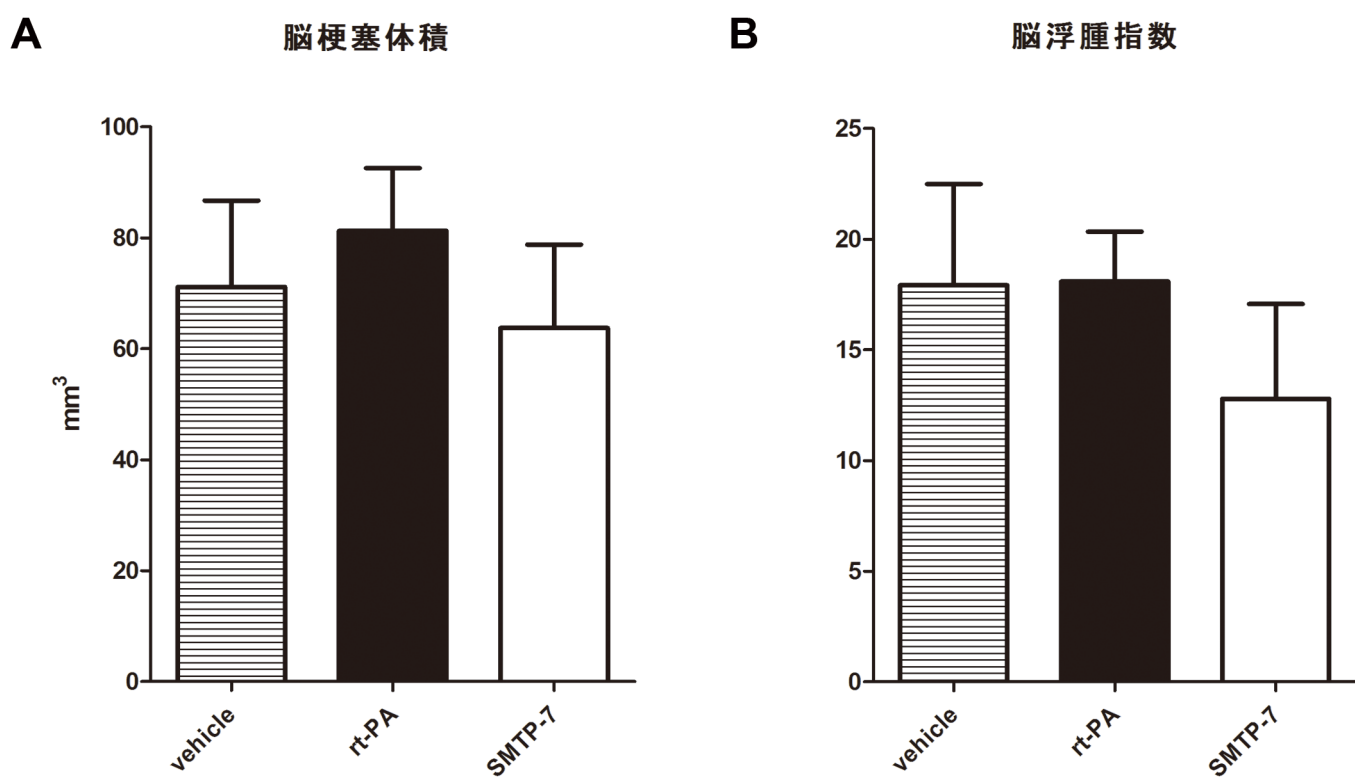
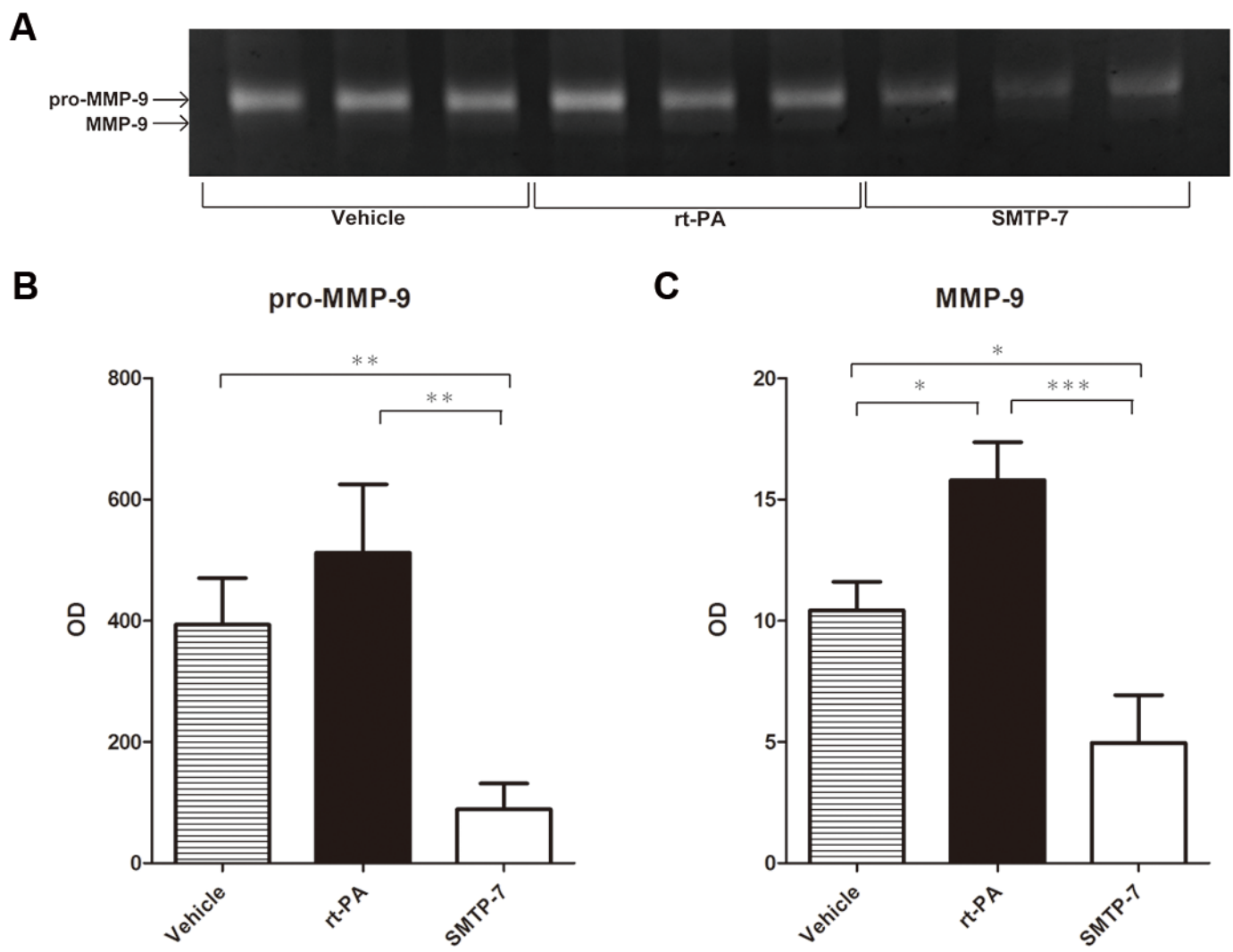
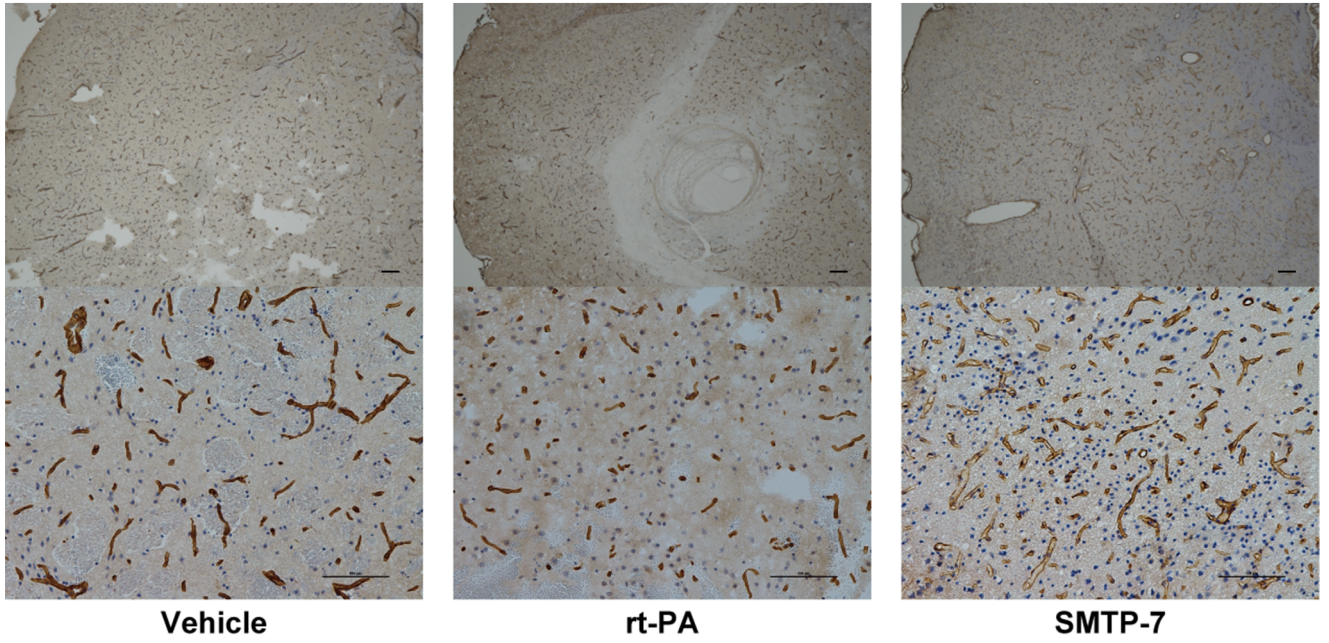


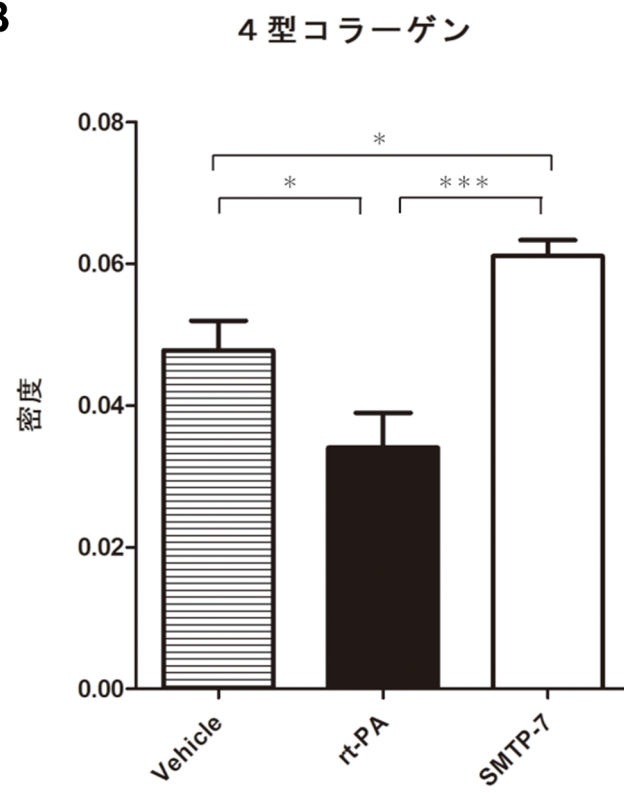
图 5



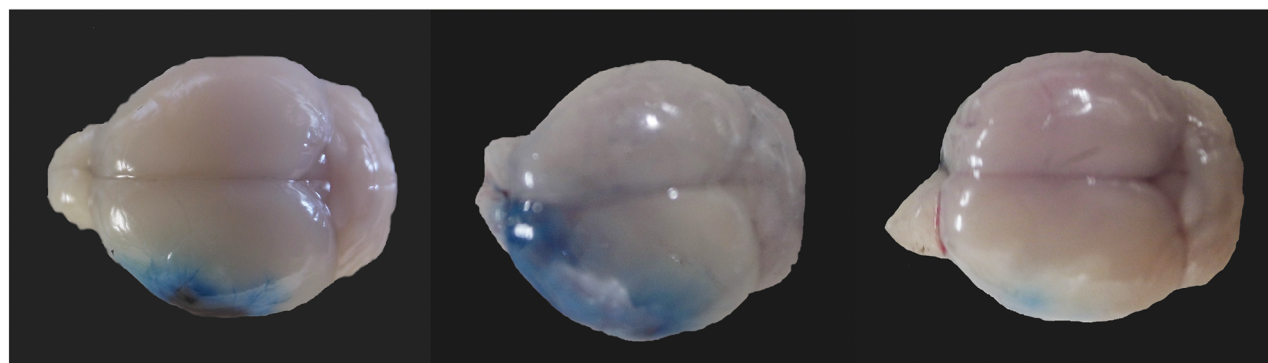
**A**



**B**



**A**



Vehicle

rt-PA

SMTP-7

**B** エバンスブルー血管外漏出指数

